

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850054

研究課題名(和文)フルクトフィリック乳酸菌のハチプロバイオティクスとしての利用

研究課題名(英文)Fructophilic lactic acid bacteria: as probiotics of honeybees

研究代表者

遠藤 明仁(Endo, Akihito)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：90445685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミツバチ消化管より、最優勢菌の一つであるフルクトフィリック乳酸菌を見出した。このフルクトフィリック乳酸菌は花や果物にも生息している乳酸菌で、フルクトースが豊富な環境に遺伝子レベルで適応・進化していることを明らかにした。この乳酸菌の中より、ミツバチ幼虫の重篤な感染症である腐粗病を引き起こす病原性細菌に対して特異的に殺菌効果を示す菌株を見出し、その有用性について研究を行った。ミツバチは農作物生産のために重要な花粉媒介昆虫であるが、近年そのコロニー数は漸減しており、将来的な食糧危機に拍車をかける恐れがある。本研究成果はミツバチ幼虫を病気から救うことで、間接的に食糧の安定供給に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, one of the predominant microbial group, fructophilic lactic acid bacteria (FLAB), were isolated from honeybee stomach. Our genome analysis revealed that the microorganisms, which inhabit in flowers and fruits as well, have adapted to their habitats at genomic level. We also found a FLAB strain which showed antagonistic activity against a honeybee foulbrood pathogen. Honeybees are important pollinators for crops, although a colony number of the honeybees is continuously decreasing in the world. This would be a possible trigger for global food crisis. The present study will be helpful to alleviate the crisis indirectly by health promotion of honeybees.

研究分野：応用微生物学

キーワード：フルクトフィリック乳酸菌 養蜂 プロバイオティクス

### 1. 研究開始当初の背景

フルクトフィリック乳酸菌 (以下 FLAB) は花や果物、果物発酵物といったフルクトース豊富な環境に生息する乳酸菌であり、生育基質としてグルコースではなくフルクトースを好むなど (図 1)、通常の乳酸菌とは大きく異なる生化学的特徴を有する<sup>1)</sup>。このような特異な性質は FLAB がフルクトース豊富な環境下に適応することで獲得した (欠落させた) 特徴であると考えられているが、詳細は明らかにされていない。

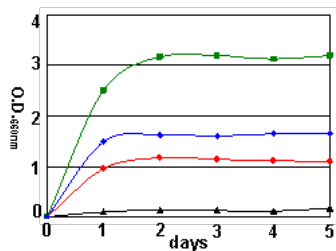


図 1. FLAB の一種 *Fructobacillus tropeoli* F214-1<sup>T</sup> 菌株のフルクトース(●)、グルコース(▲)、及びピルビン酸存在下(◆)、または酸素存在下(■)でグルコースを基質とした培地での生育

現在までのところ、*Fructobacillus* 属 5 菌株及び *Lactobacillus kunkeei* が FLAB として知られている。

この FLAB は筆者らの研究により、フィンランドにおけるミツバチ消化管の最優勢細菌の一つであることがわかっている<sup>2)</sup>。ミツバチは植物の受粉を行う有益中であり、世界中で作物生産において重要な役割を担っている。しかし、colony collapse disorder (CCD) と呼ばれる原因不明の病気により、ミツバチが世界中で激減していることが報告されている。この CCD の原因の一つと言われているのがハチ幼虫の病原性細菌である *Melissococcus plutonius* (ヨーロッパ型腐粗病菌) または *Paenibacillus larvae* (アメリカ型腐粗病菌) の感染による腐粗病であり、これらの細菌は健康なミツバチの消化管からも見出されることが明らかになっている。近年、乳酸菌等のプロバイオティクスを利用することで、病気の予防や健康増進の一助とする取り組みは、ヒトだけでなく、牛、豚、鶏などの家畜動物においても一定以上の効果を上げており、さらに多くの動物の健康増進のための利用が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は以下のことを主な目的として、研究を行った。

- ・日本のミツバチ消化管内での FLAB の分布を調べること
- ・ハチ幼虫プロバイオティクス候補となる FLAB を選抜すること
- ・選抜された FLAB 菌株のハチプロバイオティクスとしての評価を行う事

- ・FLAB の環境適応をゲノムレベルで明らかにすること

### 3. 研究の方法

本研究では、大学構内及び近郊の養蜂業者よりミツバチを取得し、サンプルとした。まず、取得したミツバチサンプルより消化管を取り出し、その消化管から筆者らが先に確立していた選択分離法により FLAB の分離を行った。分離後、菌種特異的プライマー及び系統解析により同定を行った。また、当該ミツバチが採蜜をしている花からも、同様に FLAB の分離を行った。

分離株は抗菌活性、ローヤルゼリー耐性、抗生物質耐性等を指標に特徴解析を行い、ハチ幼虫プロバイオティクスとしての評価を行った。

また、上記試験によりプロバイオティクスとして有望と考えられた菌株については、ゲノム解析を行い、類縁細菌との比較ゲノムにより、FLAB の環境適応について検討を行った。

### 4. 研究成果

用いたミツバチサンプル及び花より、それぞれ 38 菌株及び 11 菌株の FLAB を分離した。分離株を前述の方法により同定したところ、ミツバチ分離株は 38 菌株中 36 菌株 (95%) が、花分離株は 11 菌株中 8 菌株 (73%) が *L. kunkeei* と同定され、*Fructobacillus* 属は僅かであった。この結果は、筆者らが先に研究を行ったフィンランドにおけるミツバチ消化管内の FLAB の分布と類似していた。

これらの分離株に加えて、筆者らが先に分離していたミツバチ由来の FLAB を含め、*M. plutonius*, *P. larvae* 等に対する抗菌活性試験を行った。まず、生菌の FLAB を用いた腐蛆病菌寒天重層試験では、29 株が *P. larvae* に対して、3 株が *M. plutonius* に対して抗菌活性を示した。しかし、培養上清を用いた試験ではすべての菌株が *P. larvae* には抗菌的に働かなかったことから、*P. larvae* に対する抗菌活性は FLAB が生産した有機酸によるものだと考えられた。一方で、*M. plutonius* に対しては、前述の 3 株中 2 株で培養上清でも活性が確認できたことから、更に検討したところ、抗菌活性はプロテアーゼで分解されるタンパク質様の物質であることが明らかになった。そこで各種クラマトグラフィーを用いて精製を試みたところ、抗菌活性を持つ分子量 4,219 Da のペプチドの精製に成功した。現在、この物質について構造や抗菌スペクトルに関する詳細な解析を行っている。また、ミツバチ分離株及び花分離株はローヤルゼリーに対し耐性を有しており、抗生物質 (養蜂現場で使用されるオキシテトラサイクリン、ミロサマイシン、タイロシンを使用) にはわずかに耐性を示す菌株も見られたものの、耐性遺伝子は検出されず、

自然耐性である可能性が示唆された。そのため、本試験で選抜された FLAB はハチプロバイオティクスの候補菌株として有望であると考えられた。

次に、上記試験により選抜された *L. kunkeei* 菌株のゲノムを Illumina Miseq によりドラフトシーケンスし、DB に登録されている類縁菌のゲノムと比較解析を行った。その結果、*L. kunkeei* は他の *Lactobacillus* 属細菌よりも有意に小さいゲノムを有しており、保有している遺伝子数も有意に少なかった。見出された遺伝子を Cluster of Orthologous Groups (COG) に従って分類したところ、*L. kunkeei* は糖代謝に関わる遺伝子群を特異的に欠損しており (図 2)、これは *L. kunkeei* を含む FLAB が限られた種類の糖しか代謝できないという表現性状と一致していた。

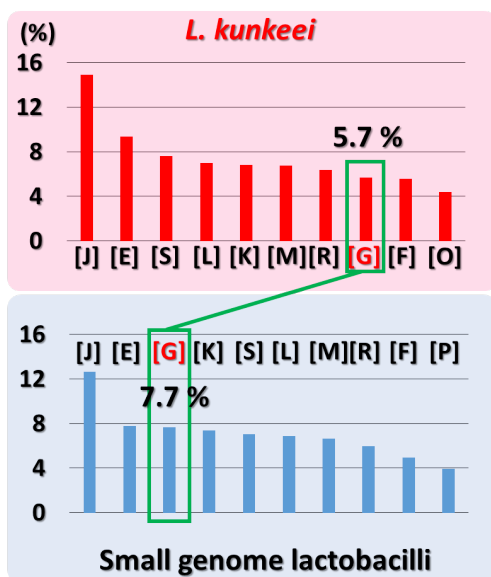


図 2. *L. kunkeei* (N=16) とその他の *Lactobacillus* 属細菌 (N=29) の全遺伝子中での各機能毎の遺伝子の割合。左から、割合が大きいものを並べている。[G] は糖代謝関連遺伝子の割合を示している。

またゲノム解析により、*L. kunkeei* は FLAB の特徴の一つとして注目されている、alcohol dehydrogenase と acetaldehyde dehydrogenase 活性を有する二機能性酵素 AdhE をコードする遺伝子 *adhE* を部分的に欠損していることが明らかになり、このことが *L. kunkeei* が FLAB である原因であると考えられた。これらのゲノム構造は同じ FLAB である *Fructobacillus* 属細菌と近似しており、FLAB はフルクトース豊富な環境下に適応することで不要な遺伝子を欠落させる、退行的進化をたどっていることが示唆された。

## 引用文献

1) Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LM. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol*. 2009 32:593-600.

2) Endo A. & Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol*. 2013 36:444-448.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Maeno S, Tanizawa Y, Kanesaki Y, Kubota E, Kumar H, Dicks L, Salminen S, Nakagawa J, Arita M, Endo A.

Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation.

*Syst Appl Microbiol*. 2016, 39:516-526.

[学会発表](計 5 件)

1. Maeno S, Tanizawa Y, Kanesaki Y, Kubota E, Kumar H, Dicks L, Salminen S, Nakagawa J, Arita M, Endo A. Genomic characterization of bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation. FEMS2017, Feria Valencia Convention & Exhibition Centre (スペイン), 2017 年 7 月 9 日 ~ 13 日.

2. 前野慎太郎、梶川揚申、中川純一、遠藤明仁. フルクトフィリック乳酸菌 *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058<sup>T</sup> の生育特性における *adhE* 遺伝子の影響. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 京都女子大学 (京都府京都市), 2017 年 3 月 17 ~ 20 日.

3. 大橋千紘、前野慎太郎、朴興国、善藤威史、Seppo Salminen、遠藤明仁、園元謙二. *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 が生産する抗ヨーロッパ腐蛆病菌活性を有する新奇バクテリオシンの同定. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 京都女子大学 (京都府京都市), 2017 年 3 月 17 ~ 20 日.

4. 遠藤明仁、谷沢靖洋、田中尚人、前野慎太郎、Himanshu Kumar、志和優、岡田早苗、吉川博文、Leon Dicks、中川純一、有田正規. *Fructobacillus* 属細菌と *Leuconostoc* 属細菌の比較ゲノム解析から明らかになった *Fructobacillus* 属細菌の退行的進化. 日本乳

酸菌学会 2016 年度大会. 北里大学 (東京都港区), 2016 年 7 月 9 日 ~ 10 日.

5. 前野慎太郎、谷沢靖洋、兼崎友、久保田恵理、Seppo Salminen、中川純一、有田正規、遠藤明仁. フルクトフィリック乳酸菌 *Lactobacillus kunkeei* の比較ゲノムから見える乳酸菌の環境適応. 日本乳酸菌学会 2016 年度大会. 北里大学 (東京都港区), 2016 年 7 月 9 日 ~ 10 日.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

遠藤 明仁 (ENDO, Akihito)

東京農業大学・生物産業学部・食品香粧学科・准教授

研究者番号 : 90445685

### (2)研究協力者

善藤 威史 (ZENDO, Takeshi)

九州大学・農学研究科・助教

研究者番号 : 50380556